

University of Groningen

## The WNT receptor Frizzled-8 in pulmonary remodelling and inflammation

Spanjer, Anita Indra Radha

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Spanjer, A. I. R. (2016). *The WNT receptor Frizzled-8 in pulmonary remodelling and inflammation*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Dutch summary /  
Nederlandse samenvatting  
Acknowledgements /  
Dankwoord  
Curriculum vitae  
List of publications

---

In dit proefschrift is onderzocht op welke manier WNT groeifactoren en Frizzled receptoren bijdragen aan het ontstaan van veranderingen in de structuur van de luchtwegen en luchtwegontsteking bij longziekten. De Frizzled receptoren zitten als een slot op de buitenkant van diverse cellen en de WNT groeifactoren werken als een sleutel, die het slot kunnen openen, waarna de cel wordt geactiveerd. Het gaat hierbij om zeer specifieke combinaties van de verschillende Frizzled receptoren en WNT groeifactoren die in de luchtwegen aanwezig zijn. Veranderingen in de structuur van de luchtwegen, zoals verdikking van de spierlaag rondom de luchtwegen of bindweefsel rondom en in de luchtwegwand (luchtwegfibrose), en luchtwegontsteking leiden uiteindelijk tot benauwdheid en zijn kenmerken van chronische longziekten zoals chronisch obstructief longlijden (COPD), astma en longfibrose. De onderliggende oorzaken van deze ziektes zijn nog niet volledig opgehelderd en medicijnen die nu worden gebruikt bestrijden wel de symptomen maar niet de onderliggende oorzaak van het ziekteproces. Recent onderzoek heeft laten zien dat WNT groeifactoren en hun receptoren een belangrijke rol zouden kunnen spelen bij het ontstaan van deze longziekten. In ons eerdere onderzoek is gebleken dat één van deze receptoren, de Frizzled-8 receptor, en de WNT groeifactoren WNT-5A en WNT-5B, meer aanwezig zijn in longfibroblasten van COPD patiënten in vergelijking met longfibroblasten van personen zonder een longziekte. Fibroblasten dragen bij aan het behoud van de structuur van de luchtwegen maar kunnen ook betrokken zijn bij ontstekingsprocessen in het longweefsel. Daarom is de doelstelling van dit proefschrift om de functionele rol van de Frizzled-8 receptor en van WNT-5A/WNT-5B te onderzoeken in de ontwikkeling van chronische longziekten, waarbij de focus ligt op COPD.

### **Frizzled-8 en veranderingen in de structuur van de luchtwegen**

Luchtwegfibroblasten kunnen worden geactiveerd door de groeifactor *transforming growth factor*-bèta (TGF- $\beta$ ), die een centrale rol speelt bij structuurveranderingen in eerdergenoemde longziekten. In **hoofdstuk 2** hebben wij aangetoond dat Frizzled-8 een rol speelt bij de activatie van fibroblasten door TGF- $\beta$ . Geactiveerde fibroblasten dragen bij aan structuurveranderingen in de luchtwegen. TGF- $\beta$  werkt niet direct via Frizzled-8, omdat TGF- $\beta$  zelf niet als sleutel op Frizzled-8 past. Daarom hebben wij in **hoofdstuk 2** onderzocht welke WNT groeifactor (sleutel) via de Frizzled-8 receptor (het slot) voor de celactivatie zorgt. Dit blijkt in luchtwegfibroblasten WNT-5B te zijn, terwijl eerder voor spiercellen is aangetoond dat dit juist WNT-5A is. Om deze bevindingen te vertalen naar het ziektebeeld longfibrose, en te bestuderen of Frizzled-8 hier ook een rol speelt, hebben wij met behulp van het toedienen van schade met behulp van de stof bleomycine longfibrose laten ontstaan in muizen. Bij het ontstaan van fibrose als gevolg van bleomycine speelt TGF- $\beta$  een belangrijke rol. Om de mogelijke rol van Frizzled-8 te onderzoeken in het ontstaan van fibrose veroorzaakt door bleomycine hebben wij in gewone muizen en in muizen die geen Frizzled-8 gen (*fzd8* gen) hebben, fibrose laten ontstaan. In de muizen zonder *fzd8* gen ontstond minder fibrose. Dit toont aan dat Frizzled-8 betrokken is bij het ontstaan van dit type fibrose waarin TGF- $\beta$  een grote rol speelt.

TGF- $\beta$  kan fibroblasten activeren zodat zij meer collageen- en fibronectine-eiwitten produceren. Collageen en fibronectine zijn een belangrijk onderdeel van de extracellulaire matrix die stevigheid en structuur biedt aan weefsels. Overproductie van collageen en fibronectine kan echter fibrose veroorzaken.

---

De verschillende eiwitten in de extracellulaire matrix kunnen ook de functie van de cellen in de matrix beïnvloeden. Een voorbeeld hiervan is decorine. Decorine is een gesuikerd eiwit in de extracellulaire matrix dat kan binden aan TGF- $\beta$ . Op deze manier remt decorine de effecten van TGF- $\beta$ . Eén van de effecten van TGF- $\beta$  is het verlagen van de decorineproductie. Decorine en TGF- $\beta$  beïnvloeden zo elkaars werking via een negatieve terugkoppeling. Eerder onderzoek heeft laten zien dat een eiwit dat behoort tot de WNT familie, WISP-1, ook door decorine gebonden kan worden waardoor de werking van WISP-1 wordt verminderd. Wij hebben in **hoofdstuk 3** kunnen aantonen dat decorine ook in staat is om WNT-5B te binden en zo de functionele effecten van WNT-5B op fibroblastactivatie kan remmen. Fibroblastactivatie leidt tot structuurveranderingen in de luchtwegen, een kenmerk van COPD. Bij COPD patiënten is aangetoond dat zij minder decorine produceren. Er is dan minder decorine beschikbaar om WNT-5B weg te vangen en dit zou een verklaring kunnen zijn voor het feit dat er meer WNT-5B wordt gevonden bij COPD patiënten en waarom COPD patiënten structuurveranderingen in de luchtwegen hebben.

### **Frizzled-8 en luchtwegontsteking**

Onze afdeling heeft eerder aangetoond dat meer Frizzled-8 aanwezig is in fibroblasten van COPD patiënten in vergelijking tot fibroblasten van patiënten zonder COPD. Niet alle COPD patiënten vertonen dezelfde ziekteverschijnselen. De populatie van COPD patiënten is op te delen in verschillende subtypes; één daarvan is chronische bronchitis. De definitie van chronische bronchitis is het ophoesten van slijm gedurende twee opeenvolgende jaren en minimaal drie maanden per jaar. In **hoofdstuk 4** laten we een verband zien tussen een verandering in het DNA van de regio rondom het *FZD8* gen, een zogenaamde *single nucleotide polymorphism* (SNP; rs663700), en chronische bronchitis). Een SNP is een verandering in het DNA die voorkomt bij tenminste 1% van de populatie. Zo kun je op basis van een SNP mensen clusteren in groepen. Ons onderzoek heeft aangetoond dat mensen die SNP rs663700 in het *FZD8* gen hebben, een grotere kans hebben op het ontstaan van chronische bronchitis dan mensen die deze SNP niet hebben. Deze bevinding duidt op een mogelijke rol van Frizzled-8 in luchtwegontsteking. In gewone muizen zorgt blootstelling aan sigarettenrook voor luchtwegontsteking en wij hebben laten zien dat in muizen zonder het *fzd8* gen deze ontsteking als gevolg van blootstelling aan sigarettenrook minder is dan bij muizen die wel het *fzd8* gen hebben. Ontstekingen in de longen als gevolg van blootstelling aan een allergeen (**hoofdstuk 6**) of aan bleomycine (**hoofdstuk 2**) zijn echter niet minder heftig bij muizen zonder het *fzd8* gen. Dit suggereert dat specifiek in het ontstekingsproces dat wordt veroorzaakt door roken een rol is weggelegd voor Frizzled-8 en dat een nieuw medicijn dat de werking van Frizzled-8 remt voor de behandeling van chronische bronchitis erg geschikt zou kunnen zijn. De resultaten die wij hebben gevonden in de muis, kunnen niet direct worden vertaald naar patiënten met chronische bronchitis. Om conclusies te kunnen trekken is verder onderzoek nodig.

Wij laten in **hoofdstuk 4** zien dat meer Frizzled-8 aanwezig is in fibroblasten van COPD patiënten die chronische bronchitis hebben, dan in fibroblasten van COPD patiënten zonder chronische bronchitis. Daarom hebben wij ook onderzocht of Frizzled-8 een functionele rol speelt in chronische bronchitis. In het ontstekingsproces bij chronische bronchitis spelen de eiwitten interleukine (IL)-6 en IL-8 een belangrijke rol. **Hoofdstuk 4**

laat zien dat IL-6 en IL-8 worden uitgescheiden door luchtwegfibroblasten en dat wanneer Frizzled-8 wordt uitgeschakeld, deze luchtwegfibroblasten minder IL-6 en IL-8 uitscheiden. IL-6 en IL-8 worden dus uitgescheiden door luchtwegfibroblasten en in dit proces speelt Frizzled-8 een belangrijke rol. Zoals hierboven is uitgelegd, hebben patiënten met chronische bronchitis last van een slijmproducerende hoest. Wat wij vonden is dat IL-6 en IL-8 uit fibroblasten epitheelcellen kunnen aanzetten tot het produceren van slijm. Omdat overvloedige slijmproductie en het ophoesten van slijm symptomen zijn van chronische bronchitis, suggereert deze bevinding een klinische relevantie voor Frizzled-8 bij chronische bronchitis.

Epitheelcellen zijn de bekledende cellen van de longen en staan in direct contact met de buitenwereld en vormen hierdoor de eerste verdedigingsbarrière voor lichaamsvreemde stoffen in de lucht. Als deze epitheelcellen worden beschadigd, verandert de communicatie tussen de epitheelcellen en de onderliggende fibroblasten. In COPD, astma en longfibrose, speelt de groeifactor TGF- $\beta$  hierbij een belangrijke rol in. Recent onderzoek heeft aangetoond dat de intracellulaire signalering van TGF- $\beta$  en WNT samenwerken in de cel, maar het is nog niet duidelijk of WNTs ook een rol spelen bij de communicatie tussen epitheelcellen en fibroblasten in de luchtwegen.

Om dit te onderzoeken, hebben wij eerst naar de aanwezigheid van WNT groeifactoren en Frizzled receptoren gekeken op de afzonderlijke cellen. Het aantal WNT groeifactoren en Frizzled receptoren op een cel verschilt namelijk per celtype. Zo is er op epitheelcellen meer WNT-4 en WNT-7B aanwezig in verhouding tot fibroblasten en op fibroblasten juist meer WNT-5A en WNT-5B in verhouding tot epitheelcellen. Het is bekend dat WNT liganden naburige cellen kunnen activeren door te binden aan Frizzled receptoren op deze cellen. Daarom hebben wij in **hoofdstuk 5** onderzocht of WNT liganden betrokken zijn bij de communicatie tussen epitheelcellen en fibroblasten. Om dit te onderzoeken hebben wij luchtwegepitheelcellen van gezonde donoren en luchtwegfibroblasten van patiënten met ernstig COPD samen in kweek gebracht; een zogenaamde *co-culture*. Wanneer deze twee celtypen samen in kweek worden gebracht, is er meer WNT-4 en WNT-7B aanwezig in de epitheelcellen van de gezonde donoren in vergelijking tot epitheelcellen die apart zijn gekweekt. De hoeveelheid WNT-5A en WNT-5B die aanwezig is in de fibroblasten veranderde niet ten opzichte van fibroblasten die apart zijn gekweekt. Wel scheiden fibroblasten in *co-culture* meer IL-6 en IL-8 uit dan fibroblasten die apart zijn gekweekt. De afgifte van IL-6 nam toe wanneer wij alle WNT signalering remden door de afgifte van WNT groeifactoren te blokkeren. Dit gold niet voor de afgifte van IL-8. Door specifieke antilichamen te gebruiken, hebben wij aan kunnen tonen dat WNT-4 de afgifte van IL-6 verlaagt. Deze bevindingen duiden erop dat WNT signalering in *co-culture* een remmende werking heeft op IL-6 afgifte, maar niet op de IL-8 afgifte.

Ons onderzoek in *co-culture* laat zien dat WNT-4 ontstekingsremmend is, terwijl eerder onderzoek in apart gekweekte epitheelcellen heeft laten zien dat WNT-4 ontstekingsbevorderend is. Deze verschillende resultaten geven aan dat WNT signalering zoveel mogelijk in multicellulaire systemen bestudeerd dient te worden.

---

### **Mogelijke therapeutische toepassingen voor Frizzled-8 signalering**

De primaire doelstelling van dit proefschrift was om de functionele rol van de Frizzled-8 receptor en WNT-5A/WNT-5B te onderzoeken in de ontwikkeling van chronische longziekten. Wij hebben laten zien dat Frizzled-8 en WNT-5B een belangrijke rol spelen bij structuurveranderingen waar TGF- $\beta$  bij betrokken is en daarnaast hebben wij een klinisch relevante rol aangetoond voor Frizzled-8 bij chronische bronchitis.

Het feit dat de Frizzled-8 receptor een belangrijke rol speelt in structuurveranderingen en in luchtwegontsteking suggereert dat het blokkeren van de werking van Frizzled-8 een mogelijk aanknopingspunt kan zijn voor het ontwikkelen van een nieuw geneesmiddel tegen chronische bronchitis. Het blijft wel lastig om een duidelijke voorspelling te doen over de geschiktheid van een dergelijk geneesmiddel. Dit komt ten eerste doordat het effect van een WNT groeifactor, bijvoorbeeld WNT-4, blijkbaar afhangt van het type celweek dat voor het onderzoek wordt gebruikt en ten tweede door de uiteenlopende reacties in muizen zonder *fzd8* gen op verschillende soorten ontsteking.

Om in te grijpen in de Frizzled-8/WNT-5B signalering kan gedacht worden aan een antilichaam tegen Frizzled-8; dit is voor te stellen als een sleutel die wel in het slot past, maar niet omgedraaid kan worden. Ook kan gedacht worden aan het remmen van WNT-5B en daarmee het remmen van de activering van fibroblasten zoals wij hebben laten zien dat decorine dat kan doen. Een belangrijk aspect dat meegenomen dient te worden in het onderzoek naar de ontwikkeling van een nieuw geneesmiddel tegen WNT/FZD signalering is dat het medicijn naar de juiste cellen wordt gestuurd door middel van doelgerichte toediening. Nader onderzoek naar de mogelijkheden hiervoor, dient zoveel mogelijk gericht te zijn op de hele long, opdat op alle celtypen en hun directe omgeving de effecten kunnen worden bestudeerd. Dit zou bijvoorbeeld kunnen met behulp van *longslices*, zeer dunne plakjes longweefsel, waar alle celtypes in hun directe omgeving kunnen worden bestudeerd. Wat echter allereerst moet gebeuren voordat verder onderzoek aan de Frizzled-8 receptor mogelijk is, is het ontwikkelen van een antilichaam tegen Frizzled-8. Hierin ligt onze volgende uitdaging.

**Belangrijkste conclusies:**

- Frizzled-8 reguleert structuurveranderingen waarbij TGF- $\beta$  een rol speelt.
- WNT-5B, maar niet WNT-5A, kan als sleutel op het slot Frizzled-8 fibroblasten activeren.
- Het gesuikerde eiwit decorine remt de effecten van WNT-5B op fibroblastactivatie.
- DNA veranderingen in het FZD8 gen staan in verband met chronisch verhoogde productie van slijm, een klinische manifestatie van chronische bronchitis.
- Fibroblasten reguleren via Frizzled-8 de slijmsecretie door het luchtwegepitheel.
- Ontsteking in de luchtwegen van muizen die ontstaat door blootstelling aan sigarettenrook wordt gereguleerd door Frizzled-8.
- Bij ontsteking in de luchtwegen van muizen die ontstaat door blootstelling aan het allergeen ovalbumine is Frizzled-8 niet betrokken.
- WNT-4 onderdrukt IL-6 afgifte uit fibroblasten in een co-culture van luchtwegepitheelcellen met fibroblasten.
- Frizzled-8 is een potentieel nieuw aangrijpingspunt voor een geneesmiddel tegen chronische bronchitis.



---